

## 明 細 書

金属イオンで一部置換または表面担持されたリン酸カルシウム多孔質球形粒子とリン酸カルシウム多孔質多層球形粒子

### 技術分野

この出願の発明は、細胞増殖用足場素材、クロマトグラフィー素材等に有用なリン酸カルシウムの多孔質球形粒子と多孔質多層球形粒子に関するものである。

### 背景技術

従来より、リン酸カルシウムをスプレイドライヤーで噴霧してリン酸カルシウムの球形粒子を製造する方法が知られている（たとえば特許文献1～3）。また、リン酸三カルシウムの一部を亜鉛で置換した焼結体や多孔質体、そのセメント材等も既に知られている。

そして、実際に、リン酸カルシウムの球形粒子は歯科用セメント、クロマトグラフィー用素材等に利用されている。そして、リン酸カルシウムの粒子は生体適合材料、あるいはDDSキャリア等の生体関連材料としてよく知られ、その利用の拡大が期待されており、特に、生体関連の物質との多層化やそれらの担持による機能性の向上や複合化が期待されているものである。

特許文献1： 特開昭62-230607号公報

特許文献2： 特開平1-152580号公報

特許文献3： 特開平4-175213号公報

### 発明の開示

しかしながら、従来では、このような機能性の向上や複合化のためにリン酸カルシウム粒子が備えるべき特性や多層化、付着担持のための要

件についての検討はほとんど進展していないのが実情である。実際、たとえば、リン酸カルシウム球形粒子との高分子等の複合体を製造する方法についても、リン酸カルシウム球形粒子に多糖類やコラーゲン等の高分子材料を単に被覆するにとどまっており、被覆や複合体の構造、それらの状態等をナノオーダーで調製するための方法は知られていない。

そこで、この出願の発明は、以上のとおりの従来技術の限界と問題点を解消し、粒子への多層化によって微量の化学物質でも的確に分離できるクロマトグラフィー用素材等として有用な、その構造や性質の制御された、リン酸カルシウムの新しい粒子やその焼成体、そしてそれらの複合体を提供することを課題としている。

この出願の発明は、上記の課題を解決するものとして、第1には、リン酸カルシウムに金属イオンが0.0001～10wt%の範囲で置換または表面担持されている、粒径が0.1～100 $\mu$ mの範囲のリン酸カルシウム多孔質球形粒子を提供する。第2には、BET法（比表面積測定法）による比表面積・細孔分布測定による気孔率が20%以上で比表面積が20m<sup>2</sup>/g以上であることを特徴とする上記多孔質球形粒子を提供し、第3には、リン酸カルシウムの微結晶からスプレードライ等により形成された多孔質粒子であることを特徴とする上記多孔質球形粒子を提供し、第4には、置換または表面担持されている金属イオンが亜鉛、マグネシウム、鉄および銅の各イオンの1種または2種以上である上記の多孔質球形粒子を、第5には、100℃～800℃の温度範囲で焼成されたものであることを特徴とするリン酸カルシウム多孔質球形粒子を、第6には、生体高分子もしくはポリエチレングリコール等の生体適合性高分子が被覆もしくは担持されたリン酸カルシウム多孔質球形粒子を、第7には、生体高分子がグリコサミノグリカンであるリン酸カルシウム多孔質球形粒子を提供する。そして、第8には、上記多孔質球形粒子に、さらに無機質多孔性粒子が被覆もしくは担持されている多孔質多層球形粒子を提供し、第9には、無機質多孔質材がリン酸カル

シウム系材料または炭酸カルシウム系無機材料である上記多孔質多層球形粒子を、第10には、表面または内部に生体高分子もしくはポリエチレングリコール等の生体適合性高分子が担持されている多孔質多層球形粒子を、第11には、生体高分子がグリコサミノグリカンであることを特徴とするリン酸カルシウム多孔質多層球形粒子を提供する。

#### 図面の簡単な説明

図1は、この発明の方法で製造した多孔質球形粒子の電子顕微鏡写真である。

図2は、実施例3における透過型電子顕微鏡像を例示したものである。

図3は、180℃で焼成した時のBET法で測定した細孔分布図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

この出願の発明は上記のとおりの特徴をもつものであるが、以下にその実施の形態について説明する。

まず、金属イオンは多くの高分子に対して結合性が高いことはよく知られているが、この出願の発明はこのような性質を利用し、リン酸カルシウム系微結晶の構成の一部を金属イオンと置換させるか、または金属イオンを表面担持させ、これを多孔質球形粒子とすることにより、リン酸カルシウムの生体適合性を保持したまま、しかも各種高分子、特に生体高分子との結合性を向上させている。さらにこの出願の発明は、金属イオンで一部置換または表面担持したリン酸カルシウム系微結晶からの多孔質球形粒子の表面を無機質の多孔材で被覆することによって吸着性を高めてもいる。

このように、リン酸カルシウムの表面の結合性および吸着性を高めることによって、無機材料と有機材料との複合材料として性質を持つ細胞増殖の足場用素材、空気清浄フィルター、クロマトグラフィー用等とし

て有用な機能性素材が提供される。

この出願の発明のリン酸カルシウム多孔質粒子は、

- A) 金属イオンで一部置換または表面担持されている
- B) 粒径が  $0.1 \sim 100 \mu\text{m}$  の範囲である
- C) 多孔質球形粒子である

ことを基本的な特徴としている。

この場合の金属イオンについては、その種類は多孔質球形粒子の用途、目的に対応して各種のものが選択されてよく、より一般的には、亜鉛 (Zn)、マグネシウム (Mg)、鉄 (Fe)、銅 (Cu) がその代表例として示される。その他、チタン (Ti)、ジルコニウム (Zr)、アルミニウム (Al)、スズ (Sn)、銀 (Ag) 等々のものが考慮されてよい。

また、リン酸カルシウムについても、周知のアパタイトをはじめとして各種であってよい。金属イオンによるリン酸カルシウムの一部置換や表面担持は、その構成原子のカルシウムの置換としてあってよく、もしくは、イオン結合やイオン性の吸着によって表面に金属イオンが担持されていてもよい。

このような金属イオンによる一部置換や担持された粒径  $0.1 \sim 100 \mu\text{m}$  の範囲のリン酸カルシウム多孔質球形粒子はこれまでに知られていないものである。

粒径が  $0.1 \mu\text{m}$  未満もしくは  $100 \mu\text{m}$  を超える場合には、多孔質球形粒子としての製造が難しくなる。

また、形状としては、球形と規定されているが、ひずんだ形状や楕円形等もこの球形の規定に含まれる。

そして、この出願の発明のリン酸カルシウム多孔質球形粒子は、担体やキャリアー素材として使用するためには、BET法(比表面積測定法)による比表面積・細孔分布測定による気孔率が20%以上で比表面積が  $20 \text{ m}^2/\text{g}$  以上である

ことが望ましい。なお、この場合の気孔率については下記の計算式によ

って算出されるものである。

$$\text{気孔率} = \text{BET総容積} / (\text{BET総容積} + \text{アパタイトの容積})$$

$$\text{アパタイトの密度} = 3.16 \text{ g/cm}^3$$

$$\rightarrow \text{アパタイトの容積} = 1 / 3.16$$

また、この出願の発明の上記リン酸カルシウム多孔質球形粒子については、リン酸カルシウムの微結晶よりスプレードライ法等によって形成した球形粒子が好ましいものとして示される。この場合には、たとえば、金属塩等の金属化合物の共存下にリン酸水溶液と水酸化カルシウム懸濁液との混合によって生成される微結晶懸濁液を用いてスプレードライによって球形粒子を形成することができる。

金属イオンで一部置換したり、表面を担持したリン酸カルシウム微結晶はこのような湿式法やあるいは乾式法で合成し、次いでスプレードライ法で噴霧することにより球形微粒子とすることができる。そしてまた、得られた粒子は100℃～800℃で焼成してもよい。

リン酸カルシウムの微結晶の大きさは限定されているわけではないが、粒径1nm～100nm程度が好ましく、物性や作業性等を考えれば5nm～50nm程度の範囲が好ましい。

金属イオンで置換したり、金属イオンを担持したリン酸カルシウム多孔質球形粒子は、その内部もしくは表面に高分子、たとえば生体高分子やポリエチレングリコール等の生体適合性高分子を被覆または担持させることができる。生体高分子は、生体組織を構成する1種または2種以上のものとして考慮され、たとえばヒアルロン酸やコンドロイチン硫酸等のグリコサミノグリカンが例示される。また、多孔質粒子には、その細孔の内部や表面に無機質多孔材を担持もしくは被覆することや、さらに、この被覆体の内部や表面に上記と同様の高分子、たとえば生体高分子を担持させてもよい。

高分子や無機質多孔材の担持、被覆は、各種の方法によって可能とされ、たとえばこれらの水溶液や懸濁液中へのリン酸カルシウム多孔質粒

子の浸漬、あるいはリン酸カルシウム多孔質粒子へのスプレーや反応堆積等の手段によって実現される。

以上の担持や被覆の量（割合）は、得られた多孔質粒子や多孔質多層粒子の利用目的、用途に応じて適宜にされてよいことは言うまでもない。

被覆する無機多孔質材としてはリン酸カルシウム系材料や炭酸カルシウム系等が好ましい。

そこで以下に実施例を示し、さらに詳しくこの出願の発明について説明する。もちろん以下の例によって発明が限定されることはない。

## 実施例

### <実施例 1>

1. 36 g または 13.6 g の塩化亜鉛をリン酸水溶液（0.6 mol / l）の 1 リットルに溶解させて 2 種類の試料を作成した。この 2 種類の試料のそれぞれを 2 リットルの水酸化カルシウム懸濁液（0.5 mol / l）に攪拌しながら 20 ml / min の滴下速度で加えた。このようにして得られた亜鉛（Zn）イオン担持アパタイト懸濁液を 180℃ に保持した 2 流体ノズルを用いたスプレイドライヤーで噴霧して球形粒子を作製した。球形粒子の粒径は 1 ~ 10  $\mu$ m の範囲であった。添付した図面 1 は、走査型電子顕微鏡（SEM）像を例示したものである。

さらに、10 ml の精製水に 30 mg のコンドロイチン硫酸（ChS）を分散させたものを上記球形粒子 500 mg に添加して、精製水で洗浄しながら吸引ろ過した後、凍結乾燥した。

また、比較のために塩化亜鉛を溶解させない以外は全て同じ条件で製造したアパタイト球形粒子を同じ条件で処理したものを凍結乾燥した。

このようにして作成した 3 種類の球形粒子を赤外線スペクトル（IR）、熱分析（TG-DTG A）、走査型電子顕微鏡観察（SEM）、エネルギー分散型 X 線（EDX）で分析した。IR 測定から、亜鉛イオン

含有アパタイトではC h Sの官能基であるS O<sub>3</sub>が観測された。しかし、亜鉛非含有アパタイトではS O<sub>3</sub>が観測されなかった。熱分析の結果、亜鉛含有アパタイトではC h Sに特有の発熱が3 0 0℃付近に観測されたが、亜鉛非含有アパタイトでは発熱が観測されなかった。E D X分析でも亜鉛含有アパタイトは硫黄に特有なスペクトルを示したが、亜鉛非含有アパタイトでは観測されなかった。なお、亜鉛の含有量に応じてコンドロイチン硫酸（C h S）含有量は約2 w t %から約4 w t %へと増加した。

#### <実施例2>

実施例1において製造した球形粒子を用いて、コンドロイチン硫酸（C h S）に代えて、1 0 m lの精製水中に3 0 m lのヒアルロン酸（H y A）を分散させ、精製水で洗浄を行ないながら吸引ろ過した後、凍結乾燥を行なった。熱分析の結果、亜鉛含有アパタイトを用いた場合はヒアルロン酸（H y A）に特異的な発熱が3 0 0℃付近に観測された。ヒアルロン酸（H y A）含有量はコンドロイチン硫酸（C h S）を用いた場合とほぼ同量であった。

#### <実施例3>

実施例1（1 3 . 6 g：塩化亜鉛）において製造したアパタイト球形粒子の薄片化をおこない、その内部構造を透過型電子顕微鏡で観察した。図2はその観察像を例示したものである。得られた球形粒子は、内部が空洞な多孔質体であることが確認された。

#### <実施例4>

実施例1（1 3 . 6 g：塩化亜鉛）において製造したアパタイト粒子を1 m o l / 1 リットルの塩化カルシウム溶液に浸漬し、遠心分離後、さらに1 m o l / 1 リットルのN a H C O<sub>3</sub>溶液に浸漬した。得られた複合体のX線回折を測定した結果、炭酸カルシウムが検出された。さらに熱分析により、その重量変化を調べたところ、アパタイトに対して1 2 w t %の炭酸カルシウムが含有していることが明らかとなった。また、

S E M観察の結果、アパタイト表面には炭酸カルシウムの結晶は観察されなかったことから、炭酸カルシウムはアパタイト球形粒子内部に存在していることが確認された。

#### ＜実施例 5＞

実施例 1（13.6 g：塩化亜鉛）において製造したアパタイト球形粒子を各温度にて焼成し、B E T法（比表面測定法）による窒素ガスを用いた比表面積・細孔分布測定を行なった。焼成温度に従い、比表面積・B E T総容量は小さくなり、たとえば、180℃における焼成では、比表面積88 m<sup>2</sup>/g、B E T総容量0.44 ml/g、気孔率58%；600℃では、比表面積56 m<sup>2</sup>/g、B E T総容量0.24 ml/g、気孔率43%；800℃では、比表面積45 m<sup>2</sup>/g、B E T総容量0.13 ml/g、気孔率29%であったものが、1200℃で焼成した試料では細孔は殆ど検出できなかった。また細孔分布は180℃で焼成した場合は、B E T法により60 nmに最大の分布を示した。この関係を示したグラフが図3である。

なお、上記の焼成温度のいずれの焼成においても、粒子の凝集は実質的に生起していないことが確認されている。

#### 産業上の利用可能性

以上詳しく説明したとおり、この出願の発明によって、生体適合材料としてのリン酸カルシウムの特徴を生かしつつ、さらに生体高分子や無機多孔材による粒子の多層化やそれらの担持によって、微量の化学物質でも的確に分離できるクロマトグラフィー用素材等として有用な、その構造や性質の制御された、リン酸カルシウムの新しい機能性粒子やその焼成体、そしてそれらの複合体が提供される。



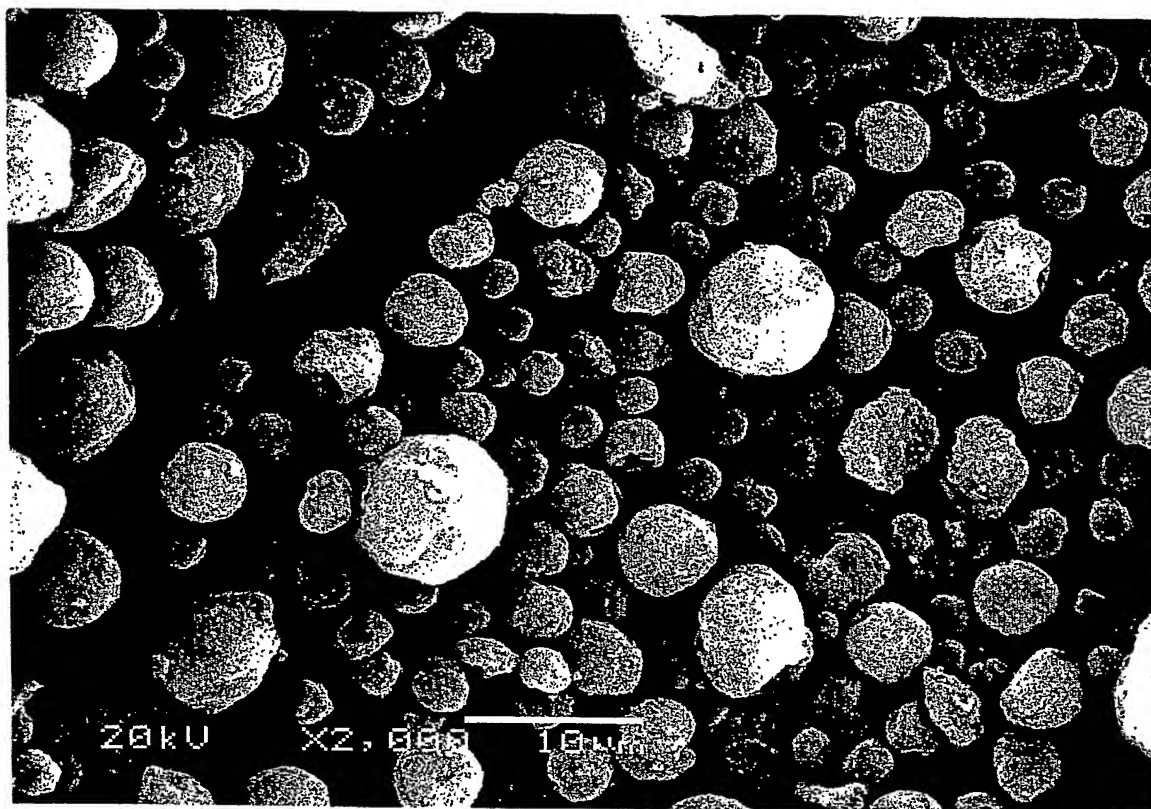
## 請求の範囲

1. リン酸カルシウムに金属イオンが0.0001～10wt%の範囲で置換または表面担持されている、粒径が0.1～100 $\mu$ mの範囲のリン酸カルシウム多孔質球形粒子。
2. BET法（比表面積測定法）による比表面積・細孔分布測定による気孔率が20%以上で比表面積が20m<sup>2</sup>/g以上であることを特徴とする請求項1のリン酸カルシウム多孔質球形粒子。
3. リン酸カルシウムの微結晶からスプレードライ等により形成された多孔質粒子であることを特徴とする請求項1または2のリン酸カルシウム多孔質球形粒子。
4. 置換または表面担持されている金属イオンが亜鉛、マグネシウム、鉄および銅の各イオンの1種または2種以上であることを特徴とする請求項1または2のリン酸カルシウム多孔質球形粒子。
5. リン酸カルシウム多孔質粒子であって、請求項1ないし4のいずれかの粒子が100℃～800℃の温度範囲において焼成されたものであることを特徴とするリン酸カルシウム多孔質球形粒子。
6. 生体高分子もしくはポリエチレングリコール等の生体適合性高分子が被覆もしくは担持されていることを特徴とする請求項1ないし5のいずれかのリン酸カルシウム多孔質球形粒子。
7. 生体高分子がグリコサミノグリカンであることを特徴とする請求項6のリン酸カルシウム多孔質球形粒子。
8. 請求項1ないし7のいずれかのリン酸カルシウム多孔質球形粒子に、無機質多孔質材が被覆されていることを特徴とする多孔質多層球形粒子。
9. 無機質多孔質材がリン酸カルシウム系材料または炭酸カルシウム系材料であることを特徴とする請求項8のリン酸カルシウム多孔質多層球形粒子。

10. 生体高分子もしくはポリエチレングリコール等の生体適合性高分子が担持されていることを特徴とする請求項8または9のリン酸カルシウム多孔質多層球形粒子。

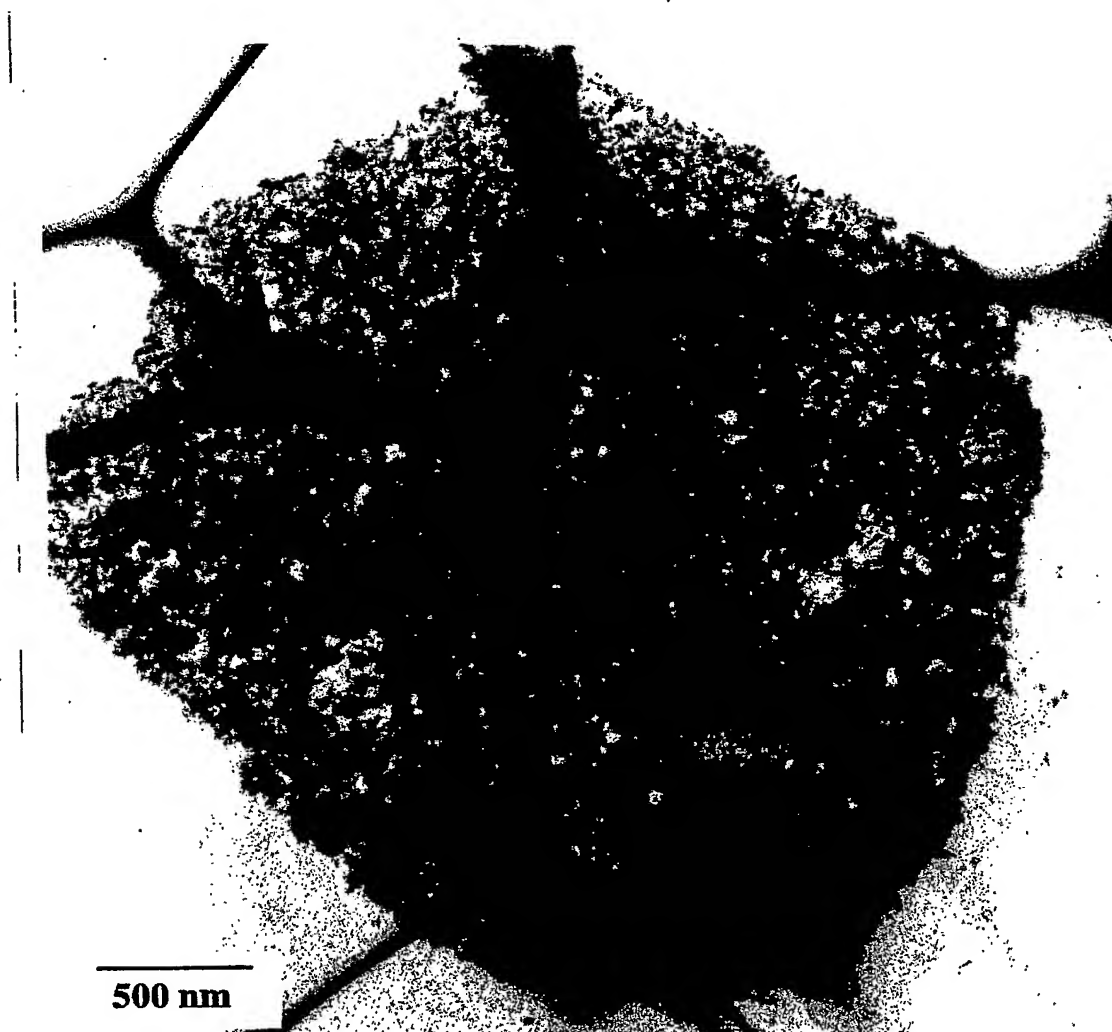
11. 生体高分子がグリコサミノグリカンであることを特徴とする請求項10のリン酸カルシウム多孔質多層球形粒子。

図 1



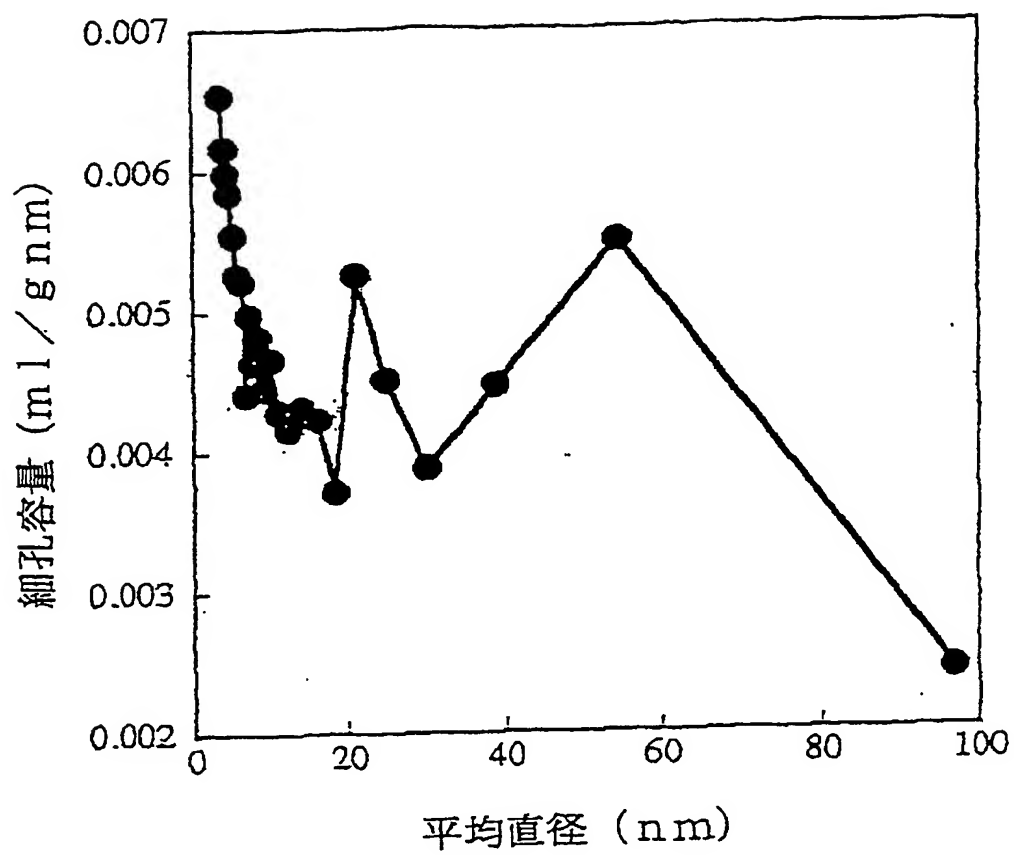
BEST AVAILABLE COPY

図 2



BEST AVAILABLE COPY

図 3



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004149

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C01B25/32, G01N30/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C01B25/32, G01N30/48, A61L27/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1926-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2004  
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2004 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2004

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 6-319500 A (Sekisui Plastics Co., Ltd.), 22 November, 1994 (22.11.94), Claims; Par. Nos. [0016] to [0017], [0029]; examples (Family: none)	1-5
X Y1	JP 2000-42096 A (Sekisui Plastics Co., Ltd.), 15 February, 2000 (15.02.00), Claims; Par. Nos. [0006], [0009]; examples (Family: none)	1-5 6, 7
Y2	JP 3-141956 A (Mitsubishi Kogyo Sement Kabushiki Kaisha), 17 June, 1991 (17.06.91), Claims; page 2, upper right column, line 18 to lower left column, line 7; examples (Family: none)	6, 7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
22 June, 2004 (22.06.04)

Date of mailing of the international search report  
06 July, 2004 (06.07.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

# **INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2004/004149

## **C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2001-270709 A (Director General of National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 02 October, 2001 (02.10.01), Claims; examples (Family: none)	8-11
A	JP 4-317404 A (The Nippon Chemical Industrial Co., Ltd.), 09 November, 1992 (09.11.92), Claims; examples (Family: none)	8-11

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl<sup>1</sup> C01B25/32 G01N30/48

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
Int. Cl<sup>1</sup> C01B25/32 G01N30/48 A61L27/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1926-1996年  
日本国公開実用新案公報 1971-2004年  
日本国登録実用新案公報 1994-2004年  
日本国実用新案登録公報 1996-2004年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 6-319500 A(積水化成品工業株式会社)1994. 11. 22 特許請求の範囲, 【0016】 - 【0017】, 【0029】, 実施例(ファミリーなし)	1-5
X Y 1	JP 2000-42096 A(積水化成品工業株式会社)2000. 2. 15 特許請求の範囲, 【0006】, 【0009】, 実施例(ファミリーなし)	1-5 6, 7
Y 2	JP 3-141956 A(三菱鉱業セメント株式会社)1991. 6. 17 特許請求の範囲, 第2頁右上欄第18行-左下欄第7行, 実施例(ファミリーなし)	6, 7

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

22. 06. 2004

国際調査報告の発送日

06. 7. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

大工原 大二

4 G

9 3 4 3

電話番号 03-3581-1101 内線 3416



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 2001-270709 A(経済産業省産業技術総合研究所長)2001.10.2 特許請求の範囲, 実施例(ファミリーなし)、	8-11
A	JP 4-317404 A(日本化学工業株式会社)1992.11.9 特許請求の範囲, 実施例 (ファミリーなし)	8-11